

Über Kinetik und Mechanismus
der Phenoloxydaseaktivierung
bei *Calliphora erythrocephala*

DIETER MERGENHAGEN

1964

Aus dem Physiologisch-chemischen Institut
der Universität München

Komm. Direktor: Professor Dr. Peter Karlson

ÜBER KINETIK UND MECHANISMUS DER PHENOLOXYDASEAKTIVIERUNG
BEI CALLIPHORA ERYTHROCEPHALA

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Dieter Mergen hagen

aus

Gröbenzell bei München

1964

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Professor Dr. Peter Karlson
Mitberichterstatter:	Professor Dr. Theodor Bücher
Dekan:	Professor Dr. Rudolf Bachmann

Tag der mündlichen Prüfung: 31. Juli 1964

Sonderdruck

Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie, Band 338, S. 42—50, 1964

Zum Tyrosinstoffwechsel der Insekten, XV

Weitere Untersuchungen über das *o*-Diphenoloxydase-System
von *Calliphora erythrocephala*

Von

Peter Karlson, Dieter Mergenhagen und Constantin E. Sekeris



Zum Tyrosinstoffwechsel der Insekten, XV¹Weitere Untersuchungen über das *o*-Diphenoloxydase-System von *Calliphora erythrocephala*

Von

Peter Karlson, Dieter Mergenhagen und Constantin E. Sekeris

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität München

(Der Schriftleitung zugegangen am 18. März 1964)

Die *o*-Diphenoloxydase* liegt bei *Calliphora erythrocephala* zunächst als inaktives Präenzym vor, das durch ein besonderes Aktivator-Enzym in die aktive Form umgewandelt wird^{2, 3}.

In der X. Mitteilung⁴ dieser Reihe haben wir über die Darstellung von Prä-*o*-diphenoloxydase-Präparaten und die Reinigung des Aktivator-Enzyms berichtet. Eine wesentliche Schwierigkeit der früheren Experimente bestand darin, daß nur schwer Präparate zu erhalten waren, die nur Aktivator oder nur Präenzym enthielten. Wir haben nun gefunden, daß die beiden Komponenten in verschiedenen Organen der *Calliphora*-Larven lokalisiert sind: Die Hämolymphe enthält nur das Präenzym, die Cuticula + Epidermis vorwiegend oder ausschließlich das Aktivator-Enzym. Durch eine geeignete Präparation der Maden können nun verhältnismäßig leicht Extrakte gewonnen werden, die nur eine Komponente enthalten. Wir beschreiben hier die Gewinnung gereinigter Komponenten und deren Wechselwirkung.

Ergebnisse

1. Reinigung und Eigenschaften des Präenzyms

Zur Darstellung der Prä-*o*-diphenoloxydase sind wir von Hämolymphe 5–6 Tage alter *Calliphora*-Larven ausgegangen. Bei der Fällung mit Ammoniumsulfat findet sich die Hauptmenge des Präenzyms in der zwischen 60 und 75% Sättigung ausfallenden Fraktion. Der Niederschlag wird in Phosphatpuffer aufgenommen, über Sephadex G 50 von Ammoniumsalzen befreit und das Protein in der Ultrazentrifuge abgeschleudert.

Reinheitsprüfung: In der Papierelektrophorese läßt sich bei pH 7 nur eine zur Anode wandernde Bande erkennen. In der analy-

* *o*-Diphenol: Sauerstoff-Oxydoreductase, EC 1.10.3.1.

¹ XIV. Mitteil.: H. Ammon u. P. Karlson, J. Insect Physiol. **10**, 525 [1964].

² N. H. Horowitz u. M. Fling in W. McElroy u. B. Glass, Amino Acid Metabolism, S. 207, The Johns Hopkins Press, Baltimore 1955.

³ IV. Mitteil.: P. Karlson u. A. Schweiger, diese Z. **323**, 199 [1961].

⁴ X. Mitteil.: A. Schweiger u. P. Karlson, diese Z. **329**, 210 [1962].

tischen Ultrazentrifuge ist neben der Hauptkomponente mit einer Sedimentationskonstanten $s_{20,w} = 15,4$ S noch ein weiteres, in geringer Menge vorhandenes Protein erkennbar (Abb. 1). Wir vermuten jedoch, daß die Hauptbande mit dem Präenzym identisch ist. Die enzymatische Aktivität ist nach Vollaktivierung sehr hoch; sie beträgt 250 Dopa-Einh./mg Protein. Bei -30° kann das Präparat wochenlang ohne Aktivitätsverlust aufbewahrt werden; bei etwa $+5^\circ$ ist die Aktivität nach 2–3 Wochen auf die Hälfte gesunken.

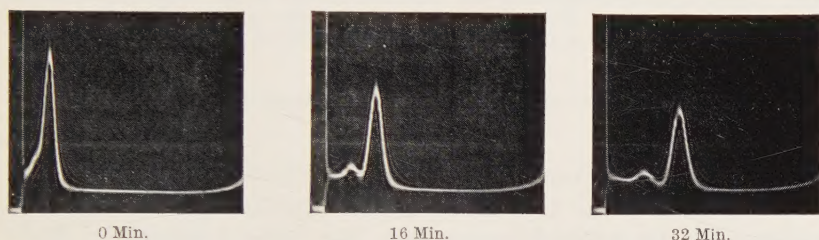


Abb. 1. Sedimentationskurve des gereinigten Präenzyms in der analytischen Ultrazentrifuge (Phywe) bei 37 000 U./Min. (etwa $37020 \times g$). Proteinkonzentration 1% in 0,067*m* Phosphatpuffer, pH 7,0.

2. Reinigung und Eigenschaften des Aktivator-Enzyms

Im Prinzip kann das Aktivator-Enzym aus dem früher⁵ beschriebenen Acetontrockenpulver hergestellt werden; ein entsprechendes Verfahren ist im Versuchsteil beschrieben. Diese Aktivator-Präparate sind aber schwer zu reinigen. Zur Gewinnung des hochgereinigten Aktivators geht man zweckmäßig von Cuticula + Epidermis aus. Die mit Hilfe einer Rollenquetsche präparierten Larvencuticeln werden in eiskalter, gepufferter Ascorbinsäure-Lösung homogenisiert; aus dem Überstand werden die Proteine mit Ammoniumsulfat fraktioniert gefällt. Die Fraktion zwischen 30% und 40% Sättigung enthält das Aktivator-Enzym; es kann in Wasser gelöst und durch Zentrifugieren von aktiver *o*-Diphenoloxydase befreit werden. In der Kälte läßt es sich einige Wochen, bei -30° sogar über Monate aufbewahren. Sulfationen (Reste von Ammoniumsulfat) begünstigen die Haltbarkeit, hemmen aber den Aktivierungsprozeß, d. h. die Wirkung des Enzyms. Sie können durch Gel-filtration oder durch Dialyse gegen Phosphatpuffer entfernt werden.

Für analytische Arbeiten haben wir das Aktivator-Enzym noch durch Ultrazentrifugieren (15 Stdn. bei $168000 \times g$) gereinigt.

Reinheitsprüfung: In der analytischen Ultrazentrifuge zeigten die reinsten Präparate nur eine einheitlich wandernde Bande, die durch Diffusion rasch breit wird (Abb. 2; $s_{20,w} = 2,9$ S). In der Elektrophorese

* 1 Dopa-Einh. *o*-Diphenoloxydase ist die Enzymmenge, die unter den Standardbedingungen bei 25° eine Extinktionszunahme von 0,01 Extinktionseinheiten bewirkt.

⁵ I. Mitteil.: P. Karlson u. H. Schmid, diese Z. **300**, 35 [1955].

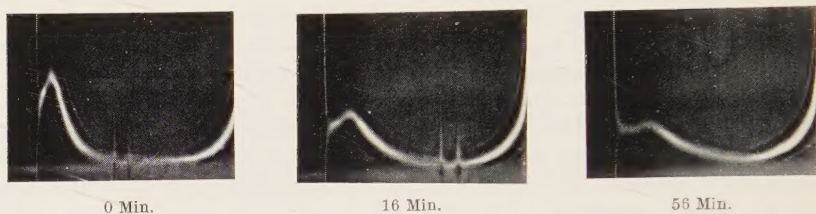


Abb. 2. Sedimentationsdiagramm des Aktivatorenzyns in der analytischen Ultrazentrifuge (Phywe) bei 60 000 U./Min. (etwa $259\,000 \times g$). Proteinkonzentration 0,3 % in Phosphatpuffer, pH 7,0.

ließ sich bei pH 7 nur eine einheitliche, anodisch wandernde Zone auffinden.

3. Reaktion zwischen Aktivator und Phenoloxydase

Von besonderem Interesse war das Studium der Aktivierungsreaktion mit den reinen Komponenten. Wie früher beschrieben², beobachtet man in Gesamthomogenaten einen „autokatalytischen“ Verlauf: Die Reaktion setzt erst nach einer Verzögerungsphase ein, wird dann schneller und später wieder langsamer; schließlich strebt die Aktivierungskurve asymptotisch einem Grenzwert, der Endaktivität, zu. Mit gereinigtem Aktivator haben wir einen anderen Verlauf gesehen: Die Aktivierung beginnt sofort mit voller Geschwindigkeit und wird langsamer, wenn die Endaktivität nahezu erreicht ist⁴.

Mit den hier beschriebenen, weitgehend reinen Komponenten ergibt sich gleichfalls ein nicht autokatalytischer Verlauf. Überdies ist die erreichte Endaktivität abhängig von der relativen Menge Aktivator, wie Abb. 3 zeigt. Setzt man Präenzym und Aktivator im Verhältnis 10:1 ein, so wird knapp die Hälfte der maximalen Aktivität erreicht. Wir haben auch das schon mit weniger gereinigten Präparaten beobachtet⁴.

Um die Frage zu untersuchen, wodurch die Verzögerungsphase bei den Aktivierungskurven von rohen Homogenaten bedingt ist, haben wir Präparate verschiedener Reinheit vermischt und die Aktivierungskurven aufgenommen. Das Ergebnis eines solchen Versuchs zeigt Abb. 4. Man erkennt, daß Mischungen der getrennt präparierten, aber nicht gereinigten Komponenten den gleichen sigmoiden Kurventyp ergeben wie die Gesamthomogenate.

Die sigmoide Aktivierungskurve entspricht nicht einer einfachen autokatalytischen Kinetik. Die mathematische Analyse der Daten⁶ zeigt, daß erhebliche Abweichungen vorliegen. Es ist deshalb wahrscheinlicher, daß der sigmoide Typ durch ein Zusammenwirken verschiedener Komponenten zustande kommt, von denen eine wieder in die Anfangsreaktion eingreift. Für eine solche Möglichkeit spricht auch die Beobachtung, daß die Aktivierbarkeit roher Prä-*o*-diphenoloxydase-Präparate

⁶ D. Mergenhagen, diese Z. (im Druck).

(d. i. Hämolymphe) bei 0° in einigen Stunden stark abnimmt (Abb. 5a). Dabei wird aber nicht das Präenzym zerstört; mit überschüssigem Aktivator lassen sich noch hohe Endaktivitäten erreichen (Abb. 5b). Die Deutung dieser Befunde ist noch nicht klar; wahrscheinlich liegt in

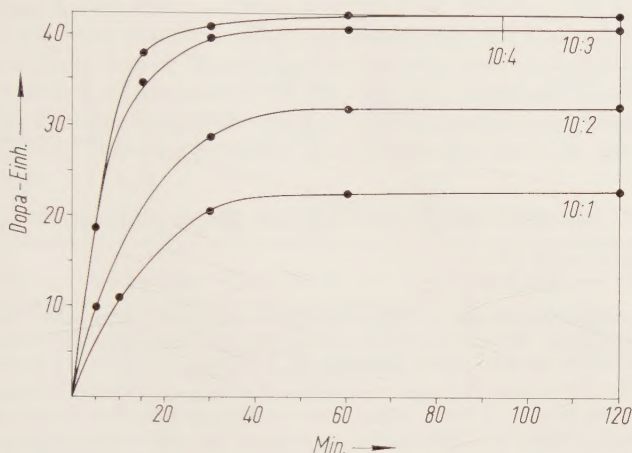


Abb. 3. Aktivierung der reinen Prä-*o*-diphenoloxydase mit reinem Aktivator. 10 ml Präenzym-Lösung (enthaltend 10 mg Protein, aus 400 Tieren) wurden mit 1–4 ml Aktivator-Lösung (enthaltend 1 mg Protein, entsprechend 5000 Tieren, pro ml) vermischt. Nach den angegebenen Zeiten wurden Proben von je 0,4 ml entnommen, verdünnt und auf *o*-Diphenoloxydase-Aktivität getestet.

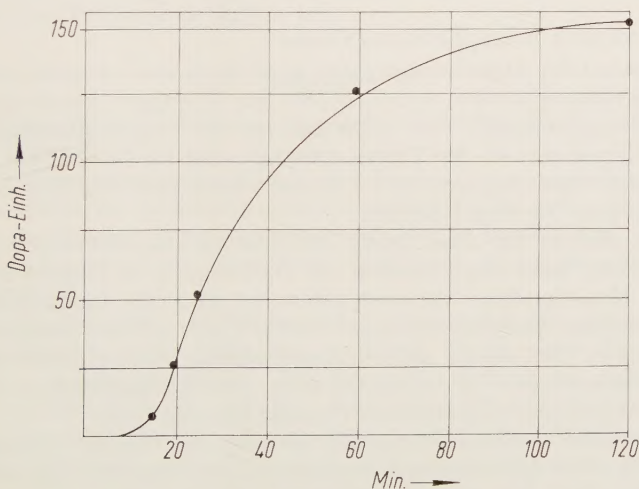


Abb. 4. Aktivierung einer ungereinigten Hämolymphe-Präparation (als Präenzym) mit einem rohen Aktivator-Präparat (Epidermishomogenat, durch Zentrifugieren bei $25000 \times g$ von Gewebstrümmern befreit). Versuchsbedingungen sonst wie bei Abb. 3.

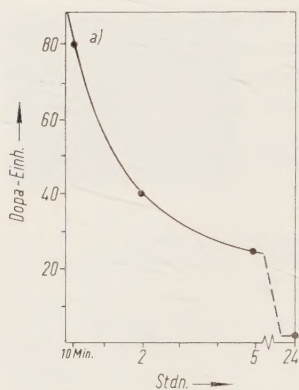


Abb. 5a

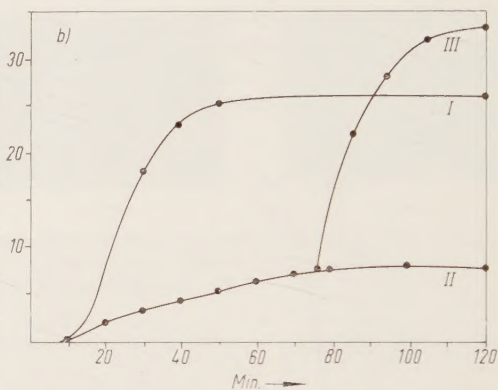


Abb. 5b

Abb. 5a. Abhängigkeit der *o*-Diphenolase-Aktivität vom Alter des Hämolymphe-Präparats. Aktivierung durch reinen (0,2 ml) Aktivator (0,002 mg Protein) bei 0° für 60 Min., dann Messung der *o*-Diphenolase-Aktivität.

Abb. 5b. Zwei typische Aktivierungskurven: Kurve I sofort nach Präparation der Hämolymphe, Kurve II nach 2stdg. Aufbewahren bei 0°. Bei Kurve III wurde 75 Min. nach Beginn der Aktivierung nochmals 1 ml Aktivator-Lösung zugesetzt (0,01 mg).

roher Hämolymphe noch ein weiterer Faktor vor, der in die Aktivierungsreaktion eingreift und möglicherweise auch für den sigmoiden Verlauf der Aktivierungskurve verantwortlich ist.

4. Die aktive *o*-Diphenolase

Resultat der Aktivierungsreaktion ist die aktive *o*-Diphenolase. Diese Enzympräparation unterscheidet sich in einigen Punkten von der früher beschriebenen⁷. Vor allem hat sie ein verhältnismäßig kleines Molekulargewicht; in der Ultrazentrifuge wird sie bei $144\,000 \times g$ erst bei langem Zentrifugieren (3–5 Stdn.) abgeschleudert. Die Lösungen zeigen keinen Tyndall-Effekt.

Das Enzym hat aber große Affinität zu den Mitochondrien und Mikrosomen. Läßt man nämlich die Aktivierung in Gegenwart gewaschener Mitochondrien vor sich gehen, so wird die entstandene *o*-Diphenolase-Aktivität schon bei $10\,000 \times g$ in 10 Min. vollständig abgeschleudert. Bei dieser Aktivierungsreaktion waren Substrate sorgfältig ausgeschlossen, so daß es sich nicht um eine Aggregation durch die bei der Oxydation entstehenden Phenole handeln kann.

Die aktive *o*-Diphenolase, die man aus frischen Homogenaten nach Ablauf der Aktivierung isolieren kann, zeigt ähnliche Eigenschaften; sie wird schon bei niedriger Zentrifugalbeschleunigung sedimentiert. Wenn man sofort nach dem Homogenisieren bei $25\,000 \times g$ zentrifugiert und

⁷ V. Mitteil.: P. Karlson u. H. Liebau, diese Z. **326**, 136 [1961].

damit die Mitochondrien entfernt, dann erhält man eine Fraktion, in der die *o*-Diphenoloxydase an Partikeln von Mikrosomengröße gebunden ist. Sie läßt sich bei 144000 $\times g$ in etwa 90 Min. abschleudern.

Die verschiedenen Präparationen unterscheiden sich nicht nur im Sedimentationsverhalten, sondern auch in ihrer Wirkung auf einwertige Phenole. Als Test auf diese Wirkung haben wir die Umwandlung von Tyrosin in Dopa (unter Einsatz radioaktiv markierten Tyrosins) herangezogen: nach der Inkubation (30 Min. bei 25°) wurde die Reaktion gestoppt, die Proteine ausgefällt und die Lösung papierchromatographisch auf gebildetes Dopa untersucht. Die Ergebnisse sind in der Tabelle niedergelegt.

Tyrosin-Hydroxylase-Aktivität verschiedener Präparate.

	% Dopa-Bildung*
Komplettes System (vgl. „Beschreibung d. Versuche“)	18
ohne NADH.	21
ohne Mitochondrien	6
ohne Präenzym und Aktivator . .	0
ohne Mitochondrien und NADH .	5
ohne Präenzym	8

* Die Prozentzahlen geben die Menge des gebildeten Dops in Prozenten der insgesamt wiedergefundenen Radioaktivität an.

Man erkennt, daß die Ansätze aus Präenzym, Aktivator und Mitochondrien eine beachtliche Tyrosin-Hydroxylase-Aktivität besitzen. Ohne Mitochondrien bleibt nur eine wesentlich geringere Restaktivität; diese geht auf die aktive *o*-Diphenoloxydase zurück, die als Verunreinigung im Aktivator-Präparat enthalten ist.

Diskussion

Die beschriebenen Reinigungsoperationen haben es uns ermöglicht, die Prä-*o*-diphenoloxydase und das Aktivator-Enzym in hochangereicherter Form darzustellen. Beide sind Proteine: sie unterscheiden sich aber wesentlich im Sedimentationsverhalten, d. h. in ihrem Molekulargewicht. Das Präenzym ist ein verhältnismäßig großes Molekül, während das Aktivatorenzym ein wesentlich niedrigeres Molekulargewicht besitzen dürfte.

Das Studium der Aktivierungsreaktion zwischen den reinen Komponenten brachte einige Tatsachen ans Licht, die die alten Hypothesen von der „autokatalytischen Aktivierung“ weitgehend entkräften. Erstens ist die Reaktion zwischen den reinen Proteinen keine autokatalytische; ihre Kinetik ist die einer gewöhnlichen Enzymreaktion, bei der ein Substrat — das Präenzym — langsam verbraucht wird. Dadurch wird die Reaktionsgeschwindigkeit kleiner und geht schließlich gegen null, d. h. die Endaktivität ist erreicht. Zweitens ist die erreichbare Endaktivität abhängig von der Menge Aktivator: bei Unterschuß des aktivierenden Enzyms wird nur ein Teil des Präenzyms aktiviert.

Eine optimale Aktivierung wird nur erreicht, wenn die Komponenten etwa im Molverhältnis von 1:1 vorliegen (für die Molekulargewichte von Präenzym und Aktivator nehmen wir ein Verhältnis von 10:1 an).

Man kann danach annehmen, daß die beiden Proteine nach der Aktivierungsreaktion nicht dissoziieren, sondern als Aggregat vorliegen, obwohl die Prä-*o*-diphenoloxydase nun aktiv geworden ist. Damit wird bei Aktivator-Unterschuß eine Produkthemmung der Aktivierungsreaktion erreicht. Eine reine Assoziation der beiden Proteine im stöchiometrischen Verhältnis scheidet allerdings auch aus: dann müßte beim Molverhältnis 4:1 nur ein Viertel (nicht wie gefunden, etwa die Hälfte) der Maximalaktivität auftreten. Der pseudo-autokatalytische Verlauf der Aktivierung, den man in Gesamthomogenaten beobachtet, läßt sich auch mit den getrennten, aber nicht gereinigten Komponenten reproduzieren. Es ist wahrscheinlich, daß er durch einen weiteren Faktor bedingt ist, der bei der Reinigung abgetrennt wird. Hierfür sprechen vor allem einige Versuche mit ungereinigter Hämolymphe. Weitere Untersuchungen hierzu sind im Gange.

Von besonderem Interesse ist schließlich noch die Substratspezifität der verschiedenen aktiven *o*-Diphenoloxydase-Präparate. Das verhältnismäßig niedermolekulare Enzym, das aus den reinen Komponenten entsteht, wirkt unter unseren Bedingungen nur als Diphenoloxydase: es erwirbt aber die Eigenschaften einer Tyrosin-Hydroxylase, wenn es an Mitochondrien gebunden ist. Ob allein die Adsorption des Proteins hierfür verantwortlich ist oder ob die Tyrosin-Hydroxylase-Aktivität durch ein Zusammenwirken der *o*-Diphenoloxydase mit den Enzymen der Mitochondrien zustande kommt, bleibt noch zu klären.

Für seine Hilfe bei den Sedimentationsmessungen danken wir Herrn H. Hölzel vom Max-Planck-Institut für Biochemie; der Deutschen Forschungsgemeinschaft haben wir für eine Sachbeihilfe zu danken.

Beschreibung der Versuche

Darstellung der Prä-*o*-diphenoloxydase

200 sauber gewaschene, 5–6 Tage alte Larven der Schmeißfliege *Calliphora erythrocephala* werden mit einer Schere im dritten Körpersegment durchgeschnitten; die austretende Hämolymphe wird in 100 ml eiskaltem 0,067*M* Phosphatpuffer, pH 7, gesammelt; durch Zentrifugieren bei 10000 $\times g$ werden die Gewebstrümmer entfernt, eine über dem wäßrigen Überstand abgesetzte Fettschicht wird durch ein Mullfilter abfiltriert.

Die folgenden Operationen werden bei +2° ausgeführt. Der klare Überstand wird mit gesätt. Ammoniumsulfatlösung auf 40% Sättigung gebracht. Die ausfallenden Proteine werden bei 10000 $\times g$ abzentrifugiert und verworfen, der Überstand wird nun auf 60% Sättigung eingestellt und die Fällung wie oben abgetrennt. Nun wird Ammoniumsulfatlösung bis zu 75% Sättigung zugesetzt und der Niederschlag, der die Hauptmenge des Präenzyms enthält, abzentrifugiert. Das Sediment wird in 50 ml 0,067*M* Phosphatpuffer, pH 7,0, gelöst und über Sephadex G 50, medium, chromatographiert. Bei der Elution mit Phosphatpuffer werden Fraktionen von je 5 ml gesammelt; durch Messung der Absorption bei 280 $m\mu$ wird der Proteingehalt bestimmt.

Die proteinhaltigen Fraktionen (Nr. 8—14) werden in der Ultrazentrifuge bei maximal $168\,000 \times g$ 5 Stdn. zentrifugiert. Das schwach gelbliche Sediment wird durch Einfrieren der Lösung und Zerschneiden der Röhren gesammelt; man erhält ein hochkonzentriertes Enzympräparat, das insgesamt etwa 2000 „potentielle Dopa-Einh.“ enthält. Die Proteinmenge wurde zu 8 mg bestimmt.

Darstellung des Aktivator-Enzyms

a) Aus Acetontrockenpulver: 500 mg Acetontrockenpulver (dargestellt nach l. c.⁵) werden mit einer Lösung von 20 mg Ascorbinsäure in 10 ml 0,067*m* Phosphatpuffer, pH 7,0, extrahiert; die Gewebstrümmer werden sofort bei $25\,000 \times g$ abzentrifugiert und der Überstand über Sephadex G 50 filtriert. Die proteinhaltigen Fraktionen (durch Messung der Absorption bei 280 *mμ* ermittelt) wurden vereinigt und die darin enthaltene aktive Diphenoloxydase in der Ultrazentrifuge abgeschleudert (maximal $144\,000 \times g$, 2—3 Stdn.). Der Überstand, der den Aktivator enthält, ist für die meisten Versuche als Enzympräparat ausreichend. Eine weitere Anreicherung durch Ammoniumsulfat-Fällung und fraktionierte Ultrazentrifugation ist mit erheblichen Aktivitätsverlusten verbunden.

b) Aus frischen Larven: Hierzu müssen zunächst Epidermis + Cuticula vom Fettkörper abpräpariert werden. Da sehr viele Tiere verarbeitet werden müssen, empfiehlt sich eine mechanische Präparation in einer Rollenpresse. Sie besteht aus zwei Metallrollen (Durchmesser 60 mm, Länge 60 mm); eine wird mit einem Motor angetrieben, die andere wird durch eine einstellbare Feder dagegen gedrückt. Zwischen beiden Rollen läuft ein etwas saugfähiges Papier (wir verwendeten Rollen von Rechenmaschinen). Die Larven (insgesamt 1000 Tiere) werden oben eingebracht, sie sollen parallel zur Laufrichtung liegen. Zwischen den Rollen werden sie zerquetscht; die Cuticeln bleiben auf dem Papierstreifen, werden mit der Pinzette abgesammelt und in eine eiskalte Lösung von 25 mg Ascorbinsäure in 200 ml 0,067*m* Phosphatpuffer, pH 7,0, geworfen. Sie werden mit einem Ultraturax (Fa. Janke & Kunkel), der auch die zähen Cuticeln zerreißt, homogenisiert; die Gewebstrümmer werden sogleich bei $10\,000 \times g$ zentrifugiert und der Überstand klar filtriert.

Der filtrierte Überstand wird nun der fraktionierten Ammoniumsulfatfällung unterworfen. Bei 30% Sättigung fallen vorwiegend Begleitproteine und wenig Aktivator aus; bei 40% Sättigung fällt die Hauptmenge des Aktivators aus. Er wird durch Zentrifugieren abgetrennt, das Sediment wird in 25 ml 0,067*m* Phosphatpuffer, pH 7,0, gelöst und nochmals in der beschriebenen Weise fraktioniert gefällt. Schließlich wird durch Zentrifugieren bei maximal $144\,000 \times g$ (3 Stdn.) die in geringer Menge vorhandene aktive *o*-Diphenoloxydase abgetrennt. Die Aktivatorlösung kann nun längere Zeit aufbewahrt werden; vor den eigentlichen Versuchen muß aber noch das Ammoniumsulfat durch Gelfiltration über Sephadex G 50 entfernt werden, da Sulfationen die Aktivierungsreaktion hemmen⁴.

Messung der *o*-Diphenoloxydase-Aktivität

Als Substrat dient 2,4-Dihydroxy-phenylalanin (Dopa; 0,5 mg pro ml 0,067*m* Phosphatpuffer, pH 6,0). 5 ml Substratlösung werden mit 0,4 ml Enzymlösung vermischt und nach 2 Min. die Absorption in einer Küvette von 20 mm Schichtlänge bei 480 *mμ* gemessen (Definition der Enzymeinheiten, Anmerkung s. S. 43).

Bestimmung der Tyrosin-Hydroxylase-Aktivität

Aktivierung in Gegenwart von Mitochondrien und Messung der Aktivität: 0,1 ml Präenzym-Lösung (entsprechend 10 Tieren; aus Hämolymphe durch Ammoniumsulfatfällung und Ultrazentrifugation gewonnen, maximale Endaktivität 200 Dopa-Einh./ml) wurden mit 0,1 ml Aktivator-Enzym (durch Ammoniumsulfatfällung und Ultrazentrifugation gereinigt, durch etwas aktive *o*-Diphenoloxydase verunreinigt) und mit gewaschenen Mitochondrien (aus Fettkörper von 6—7 Tage alten Larven in 0,25*m* Saccharose-Lösung präpariert; pro Ansatz

0,1 ml Suspension entsprechend 1 Tier) bei 25° 30 Min. inkubiert. Anschließend wird Substratlösung (enthaltend 2 mg Dehydroascorbinsäure, 0,1 mg NADH, 100 µg Tyrosin + 10000 Ipm [¹⁴C]Tyrosin) zugesetzt und weiter 30 Min. bei 25° inkubiert. Dann wurde die Reaktion durch Zusatz von 1proz. Phenylthioharnstofflösung abgestoppt, die Proteine wurden mit Methanol ausgefällt und abzentrifugiert. Die Überstände wurden eingedampft, papierchromatographisch aufgetrennt (Laufmittel: Butanol, mit 1*N* HCl gesättigt) und die Radioaktivität im Radio-papierchromatographen (Fa. Friescke & Höpfner) gemessen. Die erhaltenen Kurven wurden planimetriert und die Radioaktivität des entstandenen Dopa als % der insgesamt wiedergefundenen Aktivität ausgedrückt.

Zusammenfassung

Bei *Calliphora* ist die Prä-*o*-diphenoloxydase in der Hämolymphe, das Aktivatorenzym in der Epidermis lokalisiert; beide Proteine wurden in weitgehend reiner Form gewonnen.

Während die Aktivierungskurven roher Homogenate und unge-reinigter Präenzym- und Aktivator-Präparate einen sigmoiden Verlauf zeigen, erfolgt die Reaktion der reinen Komponenten in der Weise, daß nach schnellem Beginn eine Sättigung erreicht wird.

Die aktive *o*-Diphenoloxydase hat große Affinität zu Mitochondrien. Das an Mitochondrien gebundene Enzym zeigt neben der Diphenoloxydase-Wirkung eine erhebliche Tyrosin-Hydroxylase-Aktivität, während das lösliche Enzym, das aus den reinen Komponenten durch Aktivierung in Abwesenheit der Mitochondrien entsteht, praktisch nur als Diphenoloxydase wirkt.

Summary

In *Calliphora*, pre-*o*-diphenoloxidase is localised in the haemolymph, the activator enzyme in the epidermis. Both proteins were obtained in a very pure state.

While the activation curves for crude homogenates and unpurified preparations of preenzyme and activator are sigmoid, the purified components show an initial, rapid reaction, followed by saturation.

The active *o*-diphenoloxidase has a high affinity for mitochondria. When bound to the mitochondria, the enzyme has, in addition to diphenoloxidase activity, a high tyrosine hydroxylase activity. The soluble enzyme, produced by activation from the pure components in the absence of mitochondria, only acts as a diphenoloxidase.

Professor Dr. P. Karlson, Physiologisch-Chemisches Institut der Universität, 355 Marburg, Deutschhausstraße 1—2.

Die Kinetik der *o*-Diphenoloxydase-Bildung* in Larvenhomogenaten von *Calliphora*

Ein Beitrag zur Kinetik autokatalytischer Reaktionen

Von

Dieter Mergenhagen

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität München

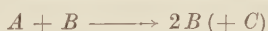
(Der Schriftleitung zugegangen am 26. März 1964)

In Homogenaten von *Calliphora*-Larven tritt die *o*-Diphenoloxydase-Aktivität erst nach einer Latenzzeit auf, die von der Konzentration des Homogenates abhängt. Diese Erscheinung wurde zuerst von Horowitz und Fling¹ für *Drosophila* beschrieben und später von Karlson und Schweiger² für *Calliphora* bestätigt. Als Erklärung wurde angenommen, daß eine Prä-*o*-diphenoloxydase und ein Aktivatorenzym in einer autokatalytischen Reaktion die aktive *o*-Diphenoloxydase entstehen lassen. Wie in der vorhergehenden Mitteilung³ beschrieben, reagieren die reinen Komponenten (Prä-*o*-diphenoloxydase und Aktivatorenzym) nicht in autokatalytischer Weise; nur mit frischer Hämolymphe (roh, 1–2 Stdn. alt) wird eine sigmoide Aktivierungskurve beobachtet. Die hier beschriebene mathematische Analyse zeigt, daß die sigmoide Kurve der Aktivierung, die man bei den Larvenhomogenaten beobachtet, nicht die einer einfachen autokatalytischen Reaktion zwischen zwei Partnern ist. Zu ganz ähnlichen Schlüssen hat auch die Untersuchung der reinen Komponenten geführt³.

Da eine eingehende mathematische Analyse der autokatalytischen Reaktionen bisher nicht beschrieben ist und die für unser Beispiel abgeleiteten Gleichungen auch auf andere Probleme angewandt werden können, teilen wir hier unsere Ergebnisse mit.

Zunächst wurde die Entstehung der *o*-Diphenoloxydase-Aktivität in Homogenaten von *Calliphora*-Larven nochmals genau gemessen. Die Kurve ist in Abb. 1 wiedergegeben. Wie ersichtlich, steigt die Aktivität nach einer Latenzzeit von 5–15 Min. an und strebt asymptotisch einem Grenzwert zu. Im Gesamtverlauf ergibt sich daher eine sigmoide Kurve.

In Abb. 1 ist auch die theoretisch zu erwartende Kurve für eine Reaktion eingezeichnet, die nach folgendem Schema abläuft:



z. B.: Trypsinogen + Trypsin $\longrightarrow$ 2 Trypsin (+ Peptid).

* *o*-Diphenol: Sauerstoff-Oxyreduktase, EC 1.10.3.1.

¹ N. H. Horowitz u. M. Fling in W. McElroy u. B. Glass, Amino Acid Metabolism, S. 207, The Johns Hopkins Press, Baltimore 1955.

² P. Karlson u. A. Schweiger, diese Z. **323**, 199 [1961].

³ P. Karlson, D. Mergenhagen u. C. E. Sekeris, diese Z. **338**, 42 [1964].

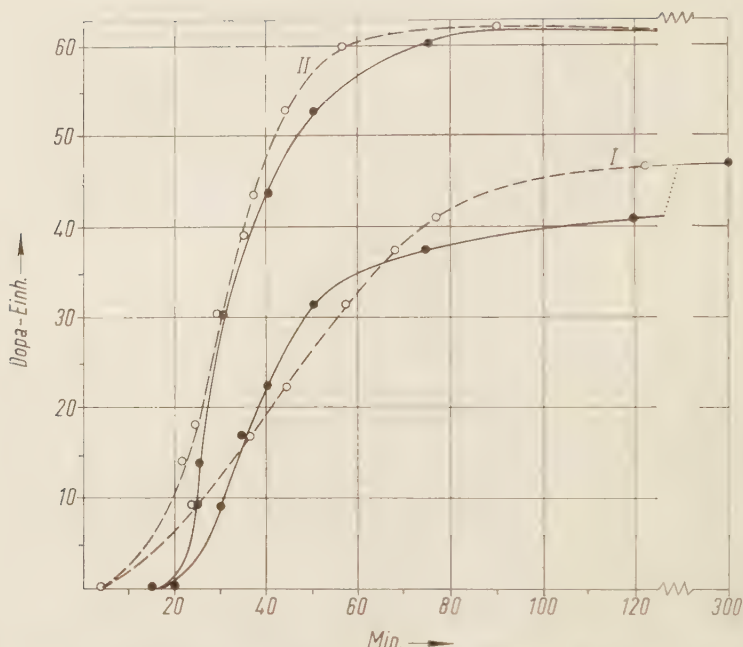
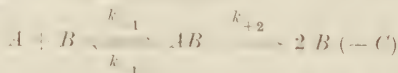


Abb. 1. Aktivierungskurven an Gesamthomogenaten von 6 (Kurve I) bzw. 7 (Kurve II) Tage alten Tieren mit den nach Gl. 6 errechneten Aktivierungs-Kurven (gestrichelt).

Es wird also angenommen, daß ein Molekül Präenzym (A) mit einem Molekül Aktivorenzym (B) reagiert und daß das Produkt dieser Reaktion die Fähigkeit besitzt, neues Präenzym in die aktive Form umzuwandeln. Ob dabei — wie in Klammern angegeben — ein Abfallprodukt entsteht oder nicht, ist irrelevant. Ein einfaches Beispiel hierfür wäre das System Trypsinogen — Trypsin: die Umwandlung wird durch Spuren Trypsin eingeleitet und beschleunigt sich dann autokatalytisch.

Ableitung der Autokatalysegleichung

Postuliert man, wie allgemein bei enzymatischen Reaktionen, einen Zwischenkomplex (AB) zwischen Substrat (Präenzym, A) und Aktivorenzym (B), so kommt man zu folgenden Reaktionsschema:



Für die Umsetzungsgeschwindigkeiten von A , B und AB lassen sich nun folgende Gleichungen aufstellen:

$$\frac{d[B]}{dt} = -k_{+1} \cdot [A] \cdot [B] + k_{-1} \cdot [AB] + 2k_{+2} [AB] \quad (1)$$

$$\frac{d[A]}{dt} = -k_{+1} [A] \cdot [B] + k_{-1} \cdot [AB] \quad (2)$$

$$\frac{d[AB]}{dt} = k_{+1} \cdot [A] \cdot [B] - k_{-1} [AB] - k_{+2} \cdot [AB]. \quad (3)$$

Da im stationären Zustand $\frac{d[AB]}{dt} = 0$ wird, kann aus Gl. 3 $[AB]$ wie folgt

$$\text{bestimmt werden: } [AB]_{\text{stat.}} = \frac{k_{+1}}{k_{-1} + k_{+2}} \cdot [A] \cdot [B] \quad (4)$$

Einsetzen dieser Gleichung in Gl. 1 ergibt nach Umformung und Einführung einer

$$\text{neuen Konstanten } k' = \frac{k_{+1} \cdot k_{+2}}{k_{-1} + k_{+2}} \quad \frac{d[B]}{dt} = k' \cdot [A] \cdot [B]^*. \quad (5)$$

Die Größen $[A]$ (Konzentration des Präenzyms) und $[B]$ (Konzentration des Aktivorenzyms) sind zeitabhängig: $[A]$ nimmt im Verlauf der Aktivierung ab, $[B]$ nimmt zu. Da nach unserer Annahme pro Molekül umgewandelten Präenzyms ein Molekül Aktivator neu entsteht, ist die Summe beider stets gleich der anfangs vorhandenen Menge. Bezeichnet man die zur Zeit t umgewandelte Menge Präenzym mit x , dann erhält Gl. 5 folgende Form:

$$\frac{dx}{dt} = k' (a - x) (b + x) \quad (6)$$

wobei a — Anfangskonzentration an Präenzym, b — Anfangskonzentration an Aktivorenzym. Die Integration dieser Gleichung ergibt:

$$k't = \frac{1}{a + b} \cdot \ln \frac{a(b + x)}{b(a - x)}. \quad (7)$$

Das Präenzym (a) hat im vorliegenden Falle nicht nur die Rolle des Substrates, sondern ist gleichzeitig Vorstufe des Katalysators. Der Einfluß der Präenzymkonzentration auf die Reaktionsgeschwindigkeit ist daher sehr groß: die Verhältnisse sind in Abb. 2 dargestellt.

Der Aktivator (b) ist in Gl. 6 und 7 als Startenzym eingesetzt. Er beeinflusst zu Beginn der Reaktion die Geschwindigkeit sehr wesentlich. Im späteren Verlauf — wenn Aktivator und Präenzym in gleicher Menge vorhanden sind, so daß die Maximalgeschwindigkeit der Autokatalyse-Reaktion erreicht ist — hat er keinen wesentlichen Einfluß mehr.

Von den drei Parametern kann lediglich die Präenzymkonzentration — auch in ungereinigten Präparaten — leicht ermittelt werden: vollständige Umwandlung des Präenzyms liefert die aktive *o*-Diphenoloxydase, die im enzymatischen Test gemessen wird. Die Endaktivität, die schließlich erreicht wird, ist ein Maß für die Menge Präenzym, die zu Beginn vorhanden war.

Die Größen k' (Geschwindigkeitskonstante) und b (Menge des Aktivators) lassen sich aus der Reaktionsgeschwindigkeit zu zwei verschiedenen Zeiten bestimmen. Aus Gl. 6 läßt sich nun eine Gleichung erhalten, in der nur b und k' als Unbekannte vorkommen (x für die betrachtete Geschwindigkeit und a können aus der Kurve entnommen werden). Einsetzen zweier (oder mehrerer) Meßwerte läßt die Parameter errechnen.

Ein Vergleich der in Abb. 1 dargestellten experimentellen Kurven mit den ebenfalls eingezeichneten theoretischen zeigt die Differenz deutlich. Die Ergebnisse sind in der Tabelle zusammengestellt.

* Laut Privatmitteilung von Doz. Dr. Ohlenbusch ergibt sich Gl. 5 auch ohne Annahme eines Zwischenkomplexes unmittelbar aus dem Grundschemata $A + B \rightarrow 2B$.

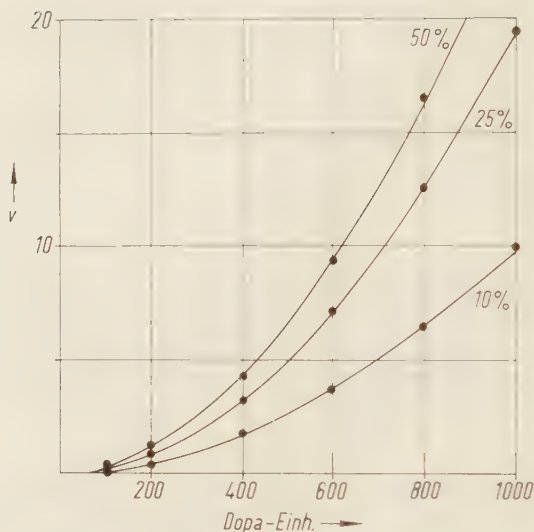


Abb. 2. Nach Gl. 7 berechnete Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit v [Dopa-Einh./Min.] von der Anfangskonzentration an Substrat (Präenzym a), wenn 10%, 25% und 50% der Endaktivität erreicht sind.

Auswertung der experimentell gemessenen Kurven in Abb. 1.

Kurve	I	II
Endaktivität in Dopa-Einheiten.	47	62
Aktivatoranfangskonzentration* (aus den Kurven berechnet)	4,1	1,1
Konstante k' (aus den Kurven berechnet). .	$1,15 \cdot 10^{-4}$	$2,1 \cdot 10^{-4}$
Halbaktivierungszeit [Min.]	42	30

* Für das Aktivorenzym wird keine Maßeinheit angegeben; die Werte sind nur durch Berechnung ermittelt und beziehen sich auf die Endaktivität.

Besonders auffallend sind die Unterschiede in der Größe der Geschwindigkeitskonstanten, die ja unter gleichen Reaktionsbedingungen auch gleich sein müßten. Außerdem tritt bei den experimentellen Kurven eine absolute Latenzphase von 5–15 Min. auf, die bei autokatalytischen Reaktionen immer fehlt.

Die hier auf Grund theoretischer Überlegungen abgeleitete Gl. 6 wurde bereits von Herriott⁴ für die Aktivierung des Pepsinogens rein empirisch gefunden. Sie gilt allerdings nur für den einfachsten Mechanismus einer autokatalytischen Reaktion.

Im Falle der Prä-*o*-diphenoloxydase-Aktivierung muß man annehmen, daß die sigmoide Form der Geschwindigkeitskurve nicht durch

⁴ R. M. Herriott, J. gen. Physiol. **21**, 501 [1937/38].

eine autokatalytische Reaktion der beiden Komponenten Präenzym und Aktivator zustande kommt (vgl. auch I. c.³ — Verhalten bei gereinigten Komponenten), sondern durch einen komplizierten Reaktionsmechanismus, an dem wahrscheinlich noch andere Faktoren beteiligt sind.

Zusammenfassung

Die Kinetik der autokatalytischen Reaktion $A \rightarrow B \rightarrow 2B (+C)$ (A = Präenzym, B = Katalysator) wird mathematisch analysiert. Für die Zeitabhängigkeit der Präenzym-Konzentration wird eine integrierte Gleichung angegeben. Ferner wird eine Methode zur Auswertung experimenteller autokatalytischer Kurven mitgeteilt.

Die Anwendung der Theorie auf die Aktivierung der Prä-*o*-diphenoloxydase in *Calliphora*-Homogenaten läßt erkennen, daß diese Reaktion nicht den beschriebenen Gesetzen folgt. Damit wird ein früher erhobener Befund bestätigt.

Summary

The kinetics of the autocatalytic reaction $A + B \rightarrow 2B (+C)$ (A = preenzyme, B = catalyst) are analysed mathematically. An integrated equation is given for the time-dependence of the preenzyme concentration. A method for the interpretation of the experimental autocatalytic curve is given.

By using this theory on the activation of pre-*o*-diphenoloxidase in homogenates of *Calliphora*, it was shown that the reaction does not obey the described laws. Thus an earlier finding is confirmed.

Dr. Dieter Mergenhagen, 8 München 13, Görresstraße 37.

Lebenslauf

Am 6. Juni 1939 wurde ich als Sohn des Studienrates Karl Mergenhagen und seiner Frau Maria, geb. Stigler, in Nürnberg geboren. Nach vier Jahren Volksschule in Windsheim/Mfr. besuchte ich das dortige Progymnasium mit Realschule, und zwar die humanistische Abteilung. Am 22. November 1950 übersiedelte ich mit meinen Eltern nach München und trat in das Theresien-Gymnasium München ein, an dem ich im Juli 1958 die Reifeprüfung ablegte. Im darauffolgenden Wintersemester 1958/59 schrieb ich mich an der Universität München, Fakultät Medizin, ein und legte hier im Sommer 1959 die naturwissenschaftliche Vorprüfung und im Frühjahr 1961 die ärztliche Vorprüfung ab. Am 30. Juli beendete ich mein Studium mit dem Staatsexamen.

